製品コード RR037A

TaKaRa

PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real Time)

説明書

本製品は、リアルタイムRT-PCRに最適化された逆転写反応キットです。伸長性能に優れたPrimeScript® RTaseを使用し短時間の反応で効率良くリアルタイムPCR用の鋳型cDNAを合成することができます。実験操作も簡単でハイスループットな解析にも適しています。2ステップのリアルタイムRT-PCRに、リアルタイムPCR試薬SYBR® *Premix Ex Taq*™ II（Perfect Real Time）やSYBR® *Premix Ex Taq*™（Perfect Real Time）、あるいは*Premix Ex Taq*™（Perfect Real Time）と組み合わせて使用します。SYBR® Greenアッセイを行う場合、TaqMan® プローブアッセイを行う場合のそれぞれに最適化したプロトコールを用意していますので、アッセイ方法にあわせて選択してください。

I. キットの内容

1. 5 × PrimeScript® Buffer（for Real Time）＊1		400 μl
2. PrimeScript® RT Enzyme Mix I		100 μl
3. Oligo dT Primer	50 μM	100 μl
4. Random 6 mers	100 μM	400 μl
5. RNase Free dH_2O		1 ml
6. EASY Dilution（for Real Time PCR）＊2		1 ml

＊1：dNTP Mixture および Mg^{2+}を含む。

＊2：total RNAやcDNAを段階希釈する際に、希釈溶液として使用します。水やTEで希釈すると正確な希釈ができない場合がありますが、このEASY Dilutionを用いると低濃度までの正確な希釈ができます。なお、このバッファーが逆転写やPCRの反応性に影響をおよぼすことはありません。希釈した鋳型溶液をそのまま逆転写反応やPCR反応の鋳型として使用できます。
単品でも購入できます。EASY Dilution（for Real Time PCR）（製品コード9160）
注）EASY Dilutionは、タカラバイオのリアルタイムPCR試薬と組み合わせてご使用ください。他社メーカーの製品については適合性を確認していません。

キット以外に必要な試薬、機器（主なもの）

・サーマルサイクラー
（または37℃、42℃恒温槽、85℃ヒートブロック）
・0.2 mlおよび1.5 mlマイクロチューブ（逆転写反応用）
・マイクロピペットおよびチップ（オートクレーブ処理したもの）

II. 保存　－20℃

III. 特長

（1） 短時間の反応で効率良くリアルタイム PCR 用の鋳型 cDNA を合成できます。2 ステップのリアルタイム RT-PCR に最適です。

（2） 逆転写用のプライマーとして Random 6 mers と Oligo dT Primer が添付されています。両方のプライマーを混合して用いることも、実験目的に応じて使い分けることも可能です。また、特定遺伝子の検出には Gene Specific Primer も使用できます。

（3） SYBR® Green アッセイ用と TaqMan® プローブアッセイ用のプロトコールを用意しています。リアルタイム PCR 時のアッセイ方法にあわせて選択してください。

（4） リアルタイム RT-PCR による定量には検量線の作成が必須です。適切な検量線の作成には、total RNA や逆転写後の cDNA を低濃度まで正確に希釈することが重要ですが、水や TE で希釈すると特に低濃度の希釈が不安定となり、利用できる検量線のレンジが狭くなる場合があります。製品添付の EASY Dilution（for Real Time PCR）を希釈に用いることで低濃度まで正確に希釈でき、幅広いレンジで検量線の作成が行えます。

IV. 操作上の注意

本キットを使用する場合の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

（1） 反応液は、数回～ 10 回分程度の Master Mix（RNase Free dH_2O、バッファー、酵素等の混液）をまとめて調製すると便利です。Master Mix を作ることにより、ピペッティングによるロスや、試薬の分注、撹拌回数が少なくなり、正確な試薬の分注を行うことができます。その結果、実験間のデータのばらつきも防げます。

（2） PrimeScript® RT Enzyme Mix I は、使用前に軽く遠心して、試薬をチューブの底に落としてください。酵素は 50％グリセロール溶液で粘度が高いので、注意深くゆっくりとピペッティングを行ってください。

（3） 試薬の分注を行うときは必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを極力防止してください。

V. 操作：逆転写反応

（RNA 調製方法は、「VII. B. RNA サンプルの調製について」（9 ページ）を参照して下さい）

【SYBR® Green Assay の場合】

1. 下記に示す逆転写反応液を氷上で調製する。
   RNA サンプル以外のコンポーネントを必要本数＋ α 調製し、マイクロチューブに分注後、RNA サンプルを添加すると良い。

＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度（または添加量）
5 × PrimeScript® Buffer（for Real Time）	2 μl	1 ×
PrimeScript® RT Enzyme Mix I	0.5 μl	
Oligo dT Primer（50 μM）＊1	0.5 μl	25 pmol
Random 6 mers（100 μM）＊1	0.5 μl	50 pmol
total RNA		
RNase Free dH_2O		
Total	10 μl ＊2	

＊ 1：Oligo dT Primer と Random 6 mers の両方を用いると mRNA 全長にわたり効率よく cDNA が合成されます。なお、各プライマーを単独で用いる場合および Gene Specific Primer の場合の使用量は以下の通りです。

プライマー	使用量	添加量
Oligo dT Primer（50 μM）	0.5 μl	25 pmol
Random 6 mers（100 μM）	0.5 μl	50 pmol
Gene Specific Primer（2 μM）	0.5 μl	1 pmol

＊ 2：逆転写反応は、必要に応じてスケールアップすることも可能です。10 μl の反応液で逆転写できるのは、およそ 500 ng までの total RNA です。

2. 逆転写反応を行う。
   37℃、15 分＊3　　（逆転写反応）
   85℃、5 秒　　（逆転写酵素を熱失活させる）
   4℃

＊ 3：Gene Specific Primer を用いる場合：
逆転写反応を 42℃、15 分で行ってください。PCR で非特異的な増幅が生じた場合には、逆転写温度を 50℃に変更すると改善される場合があります。

（注） 2. で得た逆転写反応液をリアルタイム PCR の系に持ち込む場合には、PCR 反応液容量の 10%までとしてください。

（注） TaqMan® Probe Assay 用のプロトコール（5 ページ）で逆転写反応を行うことはお勧めしません。リアルタイム PCR の際に SYBR® Green のバックグラウンドが高くなることがあります。

【TaqMan® Probe Assay の場合】

1. 下記に示す逆転写反応液を氷上で調製する。
   RNA サンプル以外のコンポーネントを必要本数＋ α 調製し、マイクロチューブに分注後、RNA サンプルを添加すると良い。

＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度（または添加量）
5 × PrimeScript® Buffer（for Real Time）	2 μl	1 ×
PrimeScript® RT Enzyme Mix I	0.5 μl	
Oligo dT Primer（50 μM）＊1	0.5 μl	25 pmol
Random 6 mers（100 μM）＊1	2 μl	200 pmol
total RNA		
RNase Free dH_2O		
Total	10 μl ＊2	

＊ 1：Oligo dT Primer と Random 6 mers の両方を用いると mRNA 全長にわたり効率よく cDNA が合成されます。なお、各プライマーを単独で用いる場合および Gene Specific Primer の場合の使用量は以下の通りです。

プライマー	使用量	添加量
Oligo dT Primer（50 μM）	0.5 μl	25 pmol
Random 6 mers（100 μM）	2 μl	200 pmol
Gene Specific Primer（2 μM）	0.5 μl	1 pmol

＊ 2：逆転写反応は、必要に応じてスケールアップすることも可能です。10 μl の反応液で逆転写できるのは、およそ 1 μg までの total RNA です。

2. 逆転写反応を行う。
   37℃、15 分＊3　　（逆転写反応）
   85℃、5 秒　　（逆転写酵素を熱失活させる）
   4℃

＊ 3：Gene Specific Primer を用いる場合：
逆転写反応を 42℃、15 分で行ってください。PCR で非特異的な増幅が生じた場合には、逆転写温度を 50℃に変更すると改善される場合があります。

（注） 2. で得た逆転写反応液をリアルタイム PCR の系に持ち込む場合には、PCR 反応液容量の 10%までとしてください。

（注） SYBR® Green Assay 用のプロトコール（前頁）で反応することも可能ですが、その場合、10 μl の反応液で逆転写できるのはおよそ 500 ng までの total RNA です。

VI. 備考：リアルタイム PCR

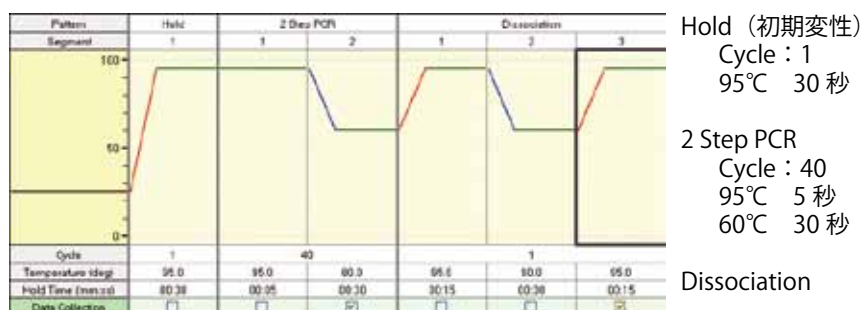
以下には、本キットで逆転写反応を行った後、SYBR® *Premix Ex Taq*™ II（Perfect Real Time）（製品コード RR081A）を用いてリアルタイム PCR を行う場合のプロトコール例を示します。
リアルタイム PCR を TaqMan® プローブ検出で行う場合には *Premix Ex Taq*™（Perfect Real Time）（製品コード RR039A）をご使用ください。

＜ Thermal Cycler Dice® Real Time System を用いる場合の操作方法＞

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。
＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度
SYBR® *Premix Ex Taq*™ II（2×）	12.5 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	1 μl	0.4 μM ＊ 1
PCR Reverse Primer（10 μM）	1 μl	0.4 μM ＊ 1
RT 反応液（cDNA 溶液）	2 μl	＊ 2
dH_2O（滅菌蒸留水）	8.5 μl	
Total	25 μl	

＊ 1：最終 primer 濃度は 0.4 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.2 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。
＊ 2：total RNA 10 pg ～ 100 ng 相当量の cDNA を template として使用することが望ましい。また、逆転写反応液の持込みは、PCR 反応液容量の 10％以下になるようにする。

2. 反応を開始する。
PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずはこのプロトコールを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください。Tm 値が低めのプライマーなど、シャトル PCR での反応が難しい場合には、3 ステップ PCR を行います。

〔シャトル PCR 標準プロトコール〕

※ 使用上の注意
本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq*® HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないで下さい。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3. 反応終了後、解析を行う。
反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。＊
＊：解析方法の詳細は、Thermal Cycler Dice® Real Time System 取扱説明書を参照してください。

＜ ABI PRISM® 7000/7700 および 7300/7500 Real-Time PCR System を用いる場合の操作方法＞

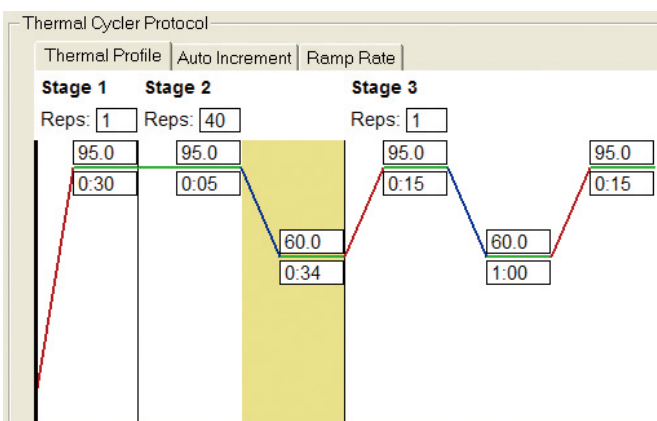
※ 各機種の取扱説明書（Applied Biosystems 社）に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。
   ＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	使用量	最終濃度
SYBR® *Premix Ex Taq*™ II（2×）	10 μl	25 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.8 μl	2 μl	0.4 μM ＊ 1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.8 μl	2 μl	0.4 μM ＊ 1
ROX Reference Dye or Dye II（50×） ＊ 3	0.4 μl	1 μl	1 ×
RT 反応液（cDNA 溶液）	2 μl	4 μl	＊ 2
dH2O（滅菌蒸留水）	6 μl	16 μl	
Total	20 μl ＊ 4	50 μl ＊ 4	

＊ 1：最終 primer 濃度は 0.4 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.2 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。
＊ 2：20 μl 反応液あたり total RNA 10 pg ～ 100 ng 相当量の cDNA を template として使用することが望ましい。また、逆転写反応液の持込みは、PCR 反応液容量の 10%以下になるようにする。
＊ 3：ROX Reference Dye II（50×）は、ROX Reference Dye（50×）より濃度が低く設定されています。7500 Real-Time PCR System で解析する場合には、ROX Reference Dye II（50 ×）の使用を推奨します。
なお、ABI PRISM 7000/7700 および 7300 Real-Time PCR System には、ROX Reference Dye（50 ×）を使用してください。
＊ 4：96 ウェルプレート、シングルチューブおよび 8 連チューブでの反応は 50 μl 反応系で行う。384 ウェルプレートでの反応は 20 μl 反応系で行う。

2. 反応を開始する。
   PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずは、このプロトコールを試し、必要に応じて PCR 反応条件を至適化してください。Tm 値が低めのプライマーなど、シャトル PCR での反応が難しい場合には、3 ステップ PCR を行います。

〔シャトル PCR 標準プロトコール〕

Stage 1：初期変性
Reps：1
95℃　30 秒
Stage 2：PCR 反応
Reps：40
95℃　5 秒
60℃　30 秒～ 34 秒＊

Dissociation Stage

＊：7700 では 30 秒に、7000 および 7300 では 31 秒に、7500 では 34 秒に設定する。

> ※ 使用上の注意
> 本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq*® HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないで下さい。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
> PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3. 反応終了後、解析を行う。
   反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。＊
   ＊：解析方法は、リアルタイム PCR 装置の取扱説明書を参照してください。

VII. Appendix

A. 実験例：逆転写反応時間と cDNA 合成量

【方法】

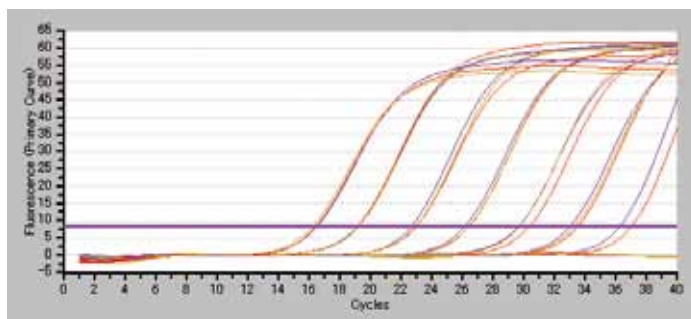
<u>逆転写反応</u>

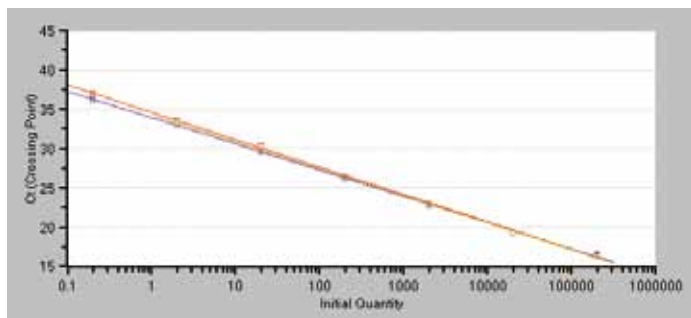
試薬：　　　PrimeScript® RT reagent Kit（Perfect Real Time）
鋳型：　　　マウス肝臓由来 total RNA 2 pg ～ 2 μg および滅菌水
反応液量：　20 μl
プライマー：Random 6 mers
反応条件：　37℃ 15、30、60 分→ 85℃ 5 秒→ 4℃

<u>リアルタイム PCR</u>

試薬：　　　SYBR® *Premix Ex Taq*™（Perfect Real Time）
鋳型：　　　上記の逆転写反応液 各 2 μl
反応液量：　25 μl
測定遺伝子：Mouse Actb
プライマー：Perfect Real Time サポートシステムのプライマーを使用
反応条件：　Thermal Cycler Dice® Real Time System 用標準プロトコール

【結果】

増幅曲線

15 分（紫）
30 分（赤）
60 分（茶）

検量線

15 分（紫）　Rsq：0.999　Eff ＝ 98.7%　Y ＝ － 3.522 ＊ LOG（X）＋ 33.94
30 分（赤）　Rsq：0.999　Eff ＝ 93.3%　Y ＝ － 3.495 ＊ LOG（X）＋ 34.61
60 分（茶）　Rsq：0.999　Eff ＝ 95.2%　Y ＝ － 3.441 ＊ LOG（X）＋ 34.28

反応時間を 15 分、30 分、60 分に設定した場合の反応性を比較しました。この実験では、いずれの反応時間でも広い鋳型濃度範囲にわたって同等な効率で反応できていることが分かります。

B. RNA サンプルの調製について

純度の高い RNA サンプルを得るためには、細胞内に含まれる RNase の作用を抑えること、また使用する器具や溶液など外部からの RNase の混入を避けることが大切です。RNA 調製にあたっては、実験者の汗や唾液に含まれる RNase の混入を防ぐため作業中は不必要に話さず、清潔なディスポーザブルグローブを着用し、RNA 調製専用の実験台を設けるなどの細心の注意を払ってください。

【器具】

実験器具に関しては、可能な限りディスポーザブルのプラスチック製品を使用してください。一般のガラス器具は以下の処理の（1）あるいは（2）を行ってから使用してください。

（1） 乾熱滅菌（180℃、60 分）

（2） ガラス器具を 0.1%ジエチルピロカーボネート（DEPC）溶液で、37℃ , 12 時間処理する。残留 DEPC を除去するためにオートクレーブ処理（120℃ , 30 分）する。

RNA 実験に用いる器具（プラスチックおよびガラス）は、他の器具と区別して RNA 専用として用いることをお勧めします。

【溶液】

実験に用いる試薬溶液は、上記の条件で乾熱滅菌（180℃ , 60 分）あるいは DEPC 処理したガラス器具で調製し、用いる蒸留水はあらかじめ 0.1% DEPC 処理を行いオートクレーブしてください。用いる溶液、蒸留水はすべて RNA 実験専用としてお使いください。

【RNA サンプルの調製法】

RT-PCR 法に用いる RNA サンプルは、通常少量の RNA があればよい場合が多いので簡便な精製法が用いられることもありますが、できれば GTC 法（グアニジンチオシアネート法）等で高純度に精製した RNA を用いることをお勧めします。
タカラバイオの FastPure® RNA Kit（製品コード 9190）や RNAiso Plus（製品コード 9108/9109）などの市販の RNA 抽出キットを用いて、短時間で高純度の total RNA を調製することもできます。
RNA サンプルは、最終的に滅菌蒸留水または TE Buffer 溶液となるように調製してください。

RNA の調製法につきましては、【書籍】＜普及版＞ PCR テクノロジー（製品コード 8556）「サンプルの簡単迅速な調製法」（p. 45 ～ 54）、実験医学増刊「PCR とその応用」、8、1063-1071（1990）なども参考にしてください。

【ゲノム DNA の混入とその対策】

total RNA サンプルには微量のゲノム DNA が混入していることがあります。ゲノム DNA も PCR の鋳型となりうるため、ゲノム DNA が混入した total RNA を鋳型として用いると解析結果が不正確になります。それを避けるためには、（1）ゲノム DNA 由来の増幅が起こらないようなプライマーを設計する、あるいは、（2）DNase I 処理によりゲノム DNA を除去する、といった対策を取ります。

（1）ゲノム DNA 由来の増幅が起こらないプライマー設計

ゲノム DNA は、エキソン、イントロン構造を持っているため、これを利用してゲノム DNA 由来の増幅が起こらないようなプライマーを設計することができます。
まず、目的遺伝子のゲノム構造を確認し、サイズの大きなイントロンを選びます。そして、このイントロンを挟む 2 つのエキソン上に上流プライマー、下流プライマーをそれぞれ設計します。イントロンのサイズが十分に大きければ、ゲノム DNA 由来の増幅が起こりません。また、イントロンのサイズが小さい場合にも、ゲノム由来の PCR 増幅産物は、mRNA 由来のものよりもサイズが大きくなるため、融解曲線分析で区別できます。
しかし、この方法は、シングルエキソンの遺伝子や偽遺伝子を持つ遺伝子には適用できません。また、イントロンを持たない生物種やゲノム情報が解析されていない生物種でも同様な問題が起こります。これらの場合には、（2）の DNase I 処理を行ってください。

（2）DNase I 処理によるゲノム DNA の除去

total RNA を抽出した後、DNase I（RNase-free）（製品コード 2215A）により混入したゲノム DNA を分解します。反応後、DNase I は、熱処理またはフェノール / クロロホルム抽出により失活させ除去します。

<u>操作手順</u>

1. 以下の反応液を調製する。

total RNA	20 ～ 50 μg
10 × DNase I Buffer	5 μl
RNase Inhibitor	20 U
DNase I（RNase-free）	2 μl（10 U）
DEPC 処理水	50 μl に fill up

2. 37℃で 20 分間反応する。
3. 以下のいずれかの方法で DNase I を失活させる。
   - A. 熱処理
     - （1） 2.5 μl の 0.5M EDTA を加えて、80℃で 2 分間インキュベートする。
     - （2） DEPC 処理水で 100 μl に fill up する。
   - B. フェノール / クロロホルム抽出
     - （1） 50 μl の DEPC 処理水と 100 μl のフェノール / クロロホルム / イソアミルアルコール（25：24：1）を加えて混合する。
     - （2） 室温、15,000 rpm で 5 分間遠心し、上層を新しいチューブに移す。
     - （3） 等量のクロロホルム / イソアミルアルコール（24：1）を加えて混合する。
     - （4）室温、15,000 rom で 5 分間遠心し、上層を新しいチューブに移す。
4. 10 μl の 3 M 酢酸ナトリウムと 250 μl の冷エタノールを加えて氷上で 10 分間静置する。
5. 4℃、15,000 rpm で 15 分間遠心し、上清を捨てる。
6. 70%エタノールで沈殿を洗浄し、4℃、15,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を捨てる。
7. 沈殿を乾燥させる。
8. 適当量の DEPC 処理水に溶解する。

【混入ゲノム DNA の確認方法】

逆転写反応をせずにリアルタイム PCR を行うことにより、ゲノム DNA の混入量を確認することができます。この実験には、ゲノム DNA と mRNA の両方から PCR 増幅が可能なプライマーを使用すると便利です。DNase I 処理によりゲノム DNA が除去されたことを確認するには、このような反応を行ってください。なお、ゲノム DNA 由来の増幅が起こらないように設計したプライマーでも、偽遺伝子由来の増幅が起こる場合があります。そのような疑いがある場合にも、この方法で確認することができます。

VIII. 関連製品

SYBR® *Premix Ex Taq*™ II（Perfect Real Time）（製品コード RR081A）
SYBR® *Premix Ex Taq*™（Perfect Real Time）（製品コード RR041A）
SYBR® Premix DimerEraser®（Perfect Real Time）（製品コード RR091A）
Premix Ex Taq™（Perfect Real Time）（製品コード RR039A）
EASY Dilution（for Real Time PCR）（製品コード 9160）
Thermal Cycler Dice® Real Time System（製品コード TP800/TP850/TP860/TP870）
Smart Cycler® II System（製品コード SC200N/SC210N）
FastPure® RNA Kit（製品コード 9190）
RNAiso Plus（製品コード 9108/9109）
Perfect Real Time サポートシステム＊

＊：ヒト、マウス、ラットの RefSeq に対してリアルタイム RT-PCR 用プライマーが設計済みです。ご注文によりカスタム合成してお届けします。本製品および SYBR® *Premix Ex Taq*™ II（Perfect Real Time）または SYBR® *Premix Ex Taq*™（Perfect Real Time）と組合せて、SYBR® Green I 検出によるリアルタイム RT-PCR を行うことができます。
http://www.takara-bio.co.jp/realtime/

IX. 参考文献

1）山本純子 , 向井博之（1999）蛋白質・核酸・酵素 44, 189-193
2）川上文清 , 石田由和（1997）細胞工学別冊「PCR Tips」94-99

X. 注意

・本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。

SYBR は Molecular Probe Inc. の登録商標です。